بسم الله الرحمن الرحیم

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و

نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه

متعلق به دانشگاه رازی است.

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی گرایش اصلاح نباتات

عنوان پایان نامه

بررسی تنوع ژنتیکی انارهای غرب ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی

استاد راهنما:
دکتر کیانوش چقامیرزا

استاد مشاور :
دکتر عیسی ارجی

نگارش:
طیبه قربانی

آذر ماه ۱۳۸۹

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی گرایش اصلاح نباتات

تحت عنوان:

بررسی تنوع ژنتیکی انارهای غرب ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی

نگارش:

طیبه قربانی

در تاریخ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنما:
دکتر کیانوش چقامیرزا با مرتبه ی علمی امضاء

۲- استاد مشاور:
دکتر عیسی ارجی با مرتبه ی علمی امضاء

۳- استاد داور داخل گروه:
دکتر دانیال کهریزی با مرتبه ی علمی امضاء

۴- استاد داور خارج از گروه:
دکتر علی اکبر مظفری با مرتبه ی علمی امضاء

سپاسگزاری

سپاس خدای را که به من قدرت تفکر و تلاش بخشید، تا بتوانم در راه پی بردن بـه اسـرار بیکـران آفـرینش و قدرتش گام بردارم؛ باشد که این خرد، ابزاری جهت خدمت به ایران عزیز گردد.

سپاس خدای را که به من همراهانی همدل و آگاه عطا فرمود تا به برکت وجودشان، راه پر فراز و نشیب پیش رو، برایم هموار گردد. سپاسگزاری از این همراهان عزیز را بر خود واجب دانسته و از خداوند متعال برایشـان سلامتی و توفیق روزافزون را خواهانم.

از دو فرشته‌ی نازنین زندگیم؛ **پدر و مادر** عزیزم که همواره مهربان و صبور در کنارم هسـتند، کمـال تشـکر را دارم. از **برادرم**، امیرحسین، که مهربانانه در انجام امور این تحقیق مرا یاری نمود، سپاسگزارم.

از استاد راهنمای گرانقدرم جناب آقـای **دکتـر کیـانوش چقـامیرزا** کـه بـا دلسـوزی و تعهـد، معلومـات ارزشمند خویش را در اختیـار اینجانـب قـرار دادنـد و همـواره یـاریگر مـن در امـور علمـی و الگـوی مـن در وظیفه‌شناسی و اخلاق بوده‌اند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

همچنین از استاد مشاور محترم، جناب آقای دکتر عیسـی ارجـی کـه در انجـام ایـن تحقیـق از راهنمـایی‌هـای ارزشمندشان بهره‌مند شدم، سپاسگزارم.

از سرکار خانم دکتر لیلا زارعی که همچون خواهری دلسـوز و مهربـان در تمـام مراحـل آزمایشـگاهی یـار و همراه من بودند کمال سپاس و امتنان را دارم.

از جناب آقایان دکتر دانیال کهریزی و دکتر علی اکبر مظفری که زحمت داوری این پایـان نامـه را پذیرفتنـد کمال تشکر را دارم.

در انجام امور این تحقیق که حدود ۲۳ ماه به طول انجامید، افـراد بسـیاری بـه اینجانـب یـاری رسـانده‌انـد کـه امیدوارم ذکر نامشان در این مجال تشکر کوچکی باشد از وجود صمیمی آنها:

سرکار خانم مهندس اکرم صادقی، جناب آقای مهندس امیر مرادی، جناب آقایان: مهندس نـادری و مهنـدس نجمایی (جهاد کشاورزی شهرستان هرسین)، مهندس مکـی و مهنـدس رسـتمی (جهـاد کشـاورزی شهرسـتان پاوه)، مهندس احمدی و مهنـدس پرویـزی (جهـاد کشـاورزی شهرسـتان گـیلان غـرب)، مهنـدس کریمـی و مهندس بهرامی (جهاد کشاورزی شهرستان سـرپل ذهـاب)، مهنـدس شـهبازی (خـدمات کشـاورزی دهسـتان دیره)، مهندس عسگری (خدمات کشاورزی دهستان ریجاب).

برای تمامی این عزیزان از درگاه پروردگار باریتعالی، سلامتی، پیروزی و سربلندی را خواستارم.

این کلام را با مناجاتی از استاد شهید، دکتر علی شریعتی، به پایان می‌برم؛ باشد که چراغ راه گردد:

خدایا: ‹‹عقیده›› مرا از دست ‹‹عقده›› ام مصون بدار.

خدایا: به من قدرت تحمل عقیده ‹‹مخالف›› ارزانی کن.

خدایا: خودخواهی را چنان در من بکش، یا چندان برکش؛ تا خودخواهی دیگران را احساس نکنم و از آن در رنج نباشم.

خدایا: مرا در ایمان ‹‹اطاعت مطلق›› بخش، تا در جهان ‹‹عصیان مطلق›› باشم.

خدایا: به من ‹‹تقوای ستیز›› بیاموز تا در انبوه مسئولیت، نلغزم؛ و از ‹‹تقوای پرهیز›› مصون‌ام دار، تا در خلوت عزلت نپوسم.

خدایا: در برابر هر آنچه انسان ماندن را به تباهی می‌کشاند، مرا با ‹‹نداشتن›› و ‹‹نخواستن›› روئین تن کن.

خدایا: به من توفیق تلاش، در شکست؛ صبر، در نومیدی؛ رفتن، بی همراه؛ جهاد، بی سلاح؛ کار، بی پاداش؛ فداکاری در سکوت؛ دین، بی دنیا؛ مذهب، بی عوام؛ عظمت، بی نام؛ خدمت، بی نان؛ ایمان، بی ریا؛ خوبی، بی نمود؛ گستاخی، بی خامی؛ مناعت، بی غرور؛ عشق، بی هوس؛ تنهایی در انبوه جمعیت؛ دوست داشتن، بی آنکه دوست بداند؛ روزی کن!

خدایا: ‹‹مسئولیت‌های شیعه بودن›› را- که علی‌وار بودن و علی‌وار زیستن و علی‌وار مردن است، و علی‌وار پرستیدن و علی‌وار اندیشیدن و علی‌وار جهاد کردن و علی‌وار کار کردن و علی‌وار سخن گفتن و علی‌وار سکوت کردن است- تا آنجا که در توان این بنده‌ی ناتوان ‹‹علی›› است، همواره فرا یادم آر.

خدایا: به من زیستنی عطا کن، که در لحظه مرگ، بر بی ثمری لحظه‌ای که برای زیستن گذشته است، حسرت نخورم؛ و مردنی عطا کن، که بر بیهودگی‌اش سوگوار نباشم.

‹‹یافتن آب به عشق است، نه به سعی؛

اما پس از سعی!››

طیبه قربانی

۱۳۸۹/۹/۳۰

تقدیم به

حضرت موعود (عج)

که جهان در انتظار عدالت اوست.

چکیده

ایران دارای غنی‌ترین ذخایر ژنتیکی انار در جهان می‌باشد. استان کرمانشاه، واقع در غرب ایران، حاوی ذخایر ژنتیکی ارزشمندی از گیاه انار است که بررسی تنوع این مجموعه اهمیت بالایی دارد. در این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی انارهای غرب ایران، تعداد ۴۴ ژنوتیپ انار از ۶ منطقه در استان کرمانشاه جمع آوری شدند. در سطح مورفولوژیک، ژنوتیپ‌ها از نظر ۴۸ صفت مربوط به ویژگی‌های درختی، برگ، گل و میوه مورد بررسی قرار گرفتند. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش ward، بر اساس صفات مورفولوژیک، ژنوتیپ‌ها را به چهار گروه مجزا تقسیم نمود. بر اساس تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، ژنوتیپ‌ها به پنج گروه تقسیم شدند و سه مؤلفه اول ۳۵/۰۲ درصد از تغییرات را توجیه نمودند.

جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های انار مورد مطالعه با استفاده از روش‌های مولکولی از دو نشانگر RAPD و ISSR استفاده گردید. تعداد ۲۰ آغازگر RAPD مورد استفاده قرار گرفت. در مجموع ۱۸۳ باند توسط این نشانگر تولید شد که از بین آنها تعداد ۹۴ باند چند شکلی نشان دادند و درصد چند شکلی متوسط ۵۱/۳۷ بود. اندازه باندها بین ۳۰۰ تا ۳۵۰۰ جفت باز متغیر بود. تعداد باندها در هر آغازگر از ۵ تا ۱۲ باند متفاوت بود. تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر RAPD با استفاده از ضریب تشابه جاکارد، ژنوتیپ‌ها را به هفت گروه مجزا تقسیم نمود که در اغلب موارد با گروه‌بندی مورفولوژیکی انطباق داشت. ضریب کوفنتیک ۰/۹۹۶ بود. تجزیه به محورهای اصلی بر اساس نشانگر RAPD، ژنوتیپ‌ها را به پنج گروه تقسیم کرد و سه مؤلفه اول ۷۳/۵۱ درصد از تغییرات را توجیه نمودند.

تعداد ۲۰ آغازگر ISSR مورد استفاده قرار گرفت که ۱۷ تا از آن ها چندشکلی نشان دادند. در مجموع ۱۱۴ باند توسط این نشانگر تولید شد که از بین آنها تعداد ۴۳ باند چند شکل بود و درصد چند شکلی متوسط ۳۷/۷۱ بود. اندازه باندها بین ۳۰۰ تا ۲۲۰۰ جفت باز متغیر بود. تعداد باندها در هر آغازگر از ۳ تا ۱۱ باند متفاوت بود. تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر ISSR، ژنوتیپ‌ها را به هفت گروه مجزا تقسیم کرد که تا حدودی با گروه‌بندی‌های قبلی انطباق داشت. ضریب کوفنتیک ۰/۹۹۲ بود. تجزیه به محورهای اصلی بر اساس نشانگر ISSR، ژنوتیپ‌ها را به پنج گروه تقسیم کرد و سه مؤلفه اول ۸۶/۰۰ درصد از تغییرات را توجیه نمودند.

آزمون منتل برای تشخیص همبستگی بین ماتریس‌های تشابه ۴۴ ژنوتیپ حاصل از نشانگرهای مختلف مولکولی و مورفولوژیکی به کار گرفته شد که بر اساس آن، ماتریس‌های ضریب تشابه جاکارد حاصل از نشانگرهای RAPD با ISSR، نشانگر RAPD با داده‌های مورفولوژیک و نشانگر ISSR با داده‌های مورفولوژیک، همبستگی معنی‌داری نشان دادند.

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های انار با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR وضعیت ژنتیکی آن‌ها را مشخص کرد. بطوری‌که ژنوتیپ‌های متفاوت را در گروه‌های جداگانه قرار داد. در این آزمایش همچنین مشاهده شد که ژنوتیپ‌های یک منطقه در گروه‌های مختلفی جای گرفتند که ناشی از تفاوت ژنوتیپ‌های درون هر منطقه است. نتایج حاصل از این تحقیق حاکی از این بود که استان کرمانشاه دارای ذخایر غنی و تنوع بالای ژنتیکی گیاه انار است که می‌توان با بررسی‌های بیشتر به ثبت این ژنوتیپ‌ها در کلکسیون انار اقدام نمود. چند شکلی قابل قبول بین ژنوتیپ‌های انار در این تحقیق مورد توجه است که می‌تواند به نوعی تایید کننده نظر دانشمندانی باشد که ایران را خاستگاه و موطن اصلی انار می‌دانند.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، انار، استان کرمانشاه، نشانگرهای مورفولوژیک، نشانگرهای مولکولی.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول :

مقدمه و بررسی منابع

۱- مقدمه ۲

۱-۱- پیدایش و تاریخچه انار ۴

۱-۲-گیاهشناسی انار ۴

۱-۳- ژنتیک انار ۵

۱-۴- اکولوژی انار ۵

۱-۵- ترکیبات شیمیایی انار ۶

۱-۶- خواص دارویی انار ۶

۱-۷- تنوع ژنتیکی و اهمیت آن در اصلاح نباتات ۷

۱-۸- نشانگرهای ژنتیکی ۷

۱-۸-۱- نشانگرهای مورفولوژیک ۸

۱-۸-۲- نشانگرهای بیوشیمیایی ۸

۱-۸-۳- نشانگرهای DNA ۹

۱-۸-۳-۱- نشانگرهای DNA غیر مبتنی بر PCR ۹

۱-۸-۳-۲- نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR ۱۰

۱-۸-۳-۲-۱- تکنیک RAPD ۱۰

۱-۸-۳-۲-۲- تکنیک ISSR ۱۱

۱-۹- بررسی تنوع ژنتیکی ۱۲

۱-۹-۱- بررسی تنوع ژنتیکی درون جمعیتی ۱۲

۱-۹-۱-۱- میزان چند شکلی ۱۳

۱-۹-۱-۲- نسبت جایگاه‌های چند شکل ۱۳

۱-۹-۱-۳- تعداد آلل‌های متغییر ۱۳

۱-۹-۱-۴- تعداد متوسط آلل‌ها در یک جایگاه ۱۳

۱-۹-۱-۵- تعداد آلل موثر(A_e) ۱۴

۱-۹-۱-۶- معیارهای محتوای اطلاعات نشانگر ها ۱۴

۱-۹-۱-۷- احتمال همسانی (PI) ۱۵

۱-۹-۱-۸- قدرت تفکیک (D) ۱۵

۱-۹-۱-۹- محتوای اطلاعاتی پلی‌مورفیسم (PIC) ۱۵

۱-۹-۲- بررسی تنوع ژنتیکی بین جمعیتی ۱۵

۱-۹-۲-۱- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) ۱۶

۱-۹-۳- مدل‌های فاصله ۱۶

۱-۹-۴- روش‌های تجزیه چند متغییره ۱۷

۱-۹-۴-۱- تجزیه خوشه‌ای ۱۷
۱-۹-۴-۲- تجزیه به محورهای اصلی ۱۸
۱-۱۰- تخمین فاصله و شباهت ژنتیکی ۱۸
۱-۱۱- پژوهش‌های انجام شده ۲۰
۱-۱۱-۱- پژوهش‌های مرتبط با انار ۲۰
۱-۱۱-۲- پژوهش‌های مرتبط با استفاده از نشانگرهای DNA در سایر گیاهان ۲۲

فصل دوم :

مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد گیاهی ۲۷
۲-۲- اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک ۲۷
۲-۳- مطالعات مولکولی ۳۰
۲-۳-۱- استخراج DNA ۳۱
۲-۳-۱-۱- روش ورابی و همکاران (CTAB و کربن فعال) ۳۲
۲-۳-۱-۲- خالص سازی DNA استخراج شده ۳۳
۲-۳-۲- تعیین کیفیت و کمیت DNA ۳۴
۲-۳-۲- ۱-تعیین کیفیت نمونه‌های DNA ۳۴
۲-۳-۲-۲- تعیین کمیت نمونه‌های DNA ۳۴
۲-۴- واکنش PCR ۳۶
۲-۴-۱- برنامه‌های استفاده شده برای آغازگرهای RAPD ۳۷
۲-۴-۲- برنامه‌های استفاده شده برای آغازگرهای ISSR ۳۸
۲-۵- الکتروفورز و رنگ آمیزی ژل آگارز ۳۹
۲-۶- محاسبات آماری ۴۰
۲-۶-۱- تجزیه و تحلیل داده‌های مورفولوژیکی ۴۰
۲-۶-۲- تجزیه و تحلیل داده های مولکولی ۴۰

فصل سوم:

نتایج و بحث

۳-۱- تجزیه و تحلیل داده‌های مورفولوژیک ۴۲
۳-۱-۱- تجزیه خوشه‌ای ۴۲
۳-۱-۲- تجزیه به مولفه‌های اصلی بر اساس صفات مورفولوژیک ۴۵
۳-۲- نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی ۴۷
۳-۲-۱- نتایج حاصل از نشانگر RAPD ۴۸
۳-۲-۱-۱- بررسی ماتریس تشابه جاکارد و دایس بر اساس نشانگر RAPD ۴۸
۳-۲-۱-۲- نتایج حاصل از تجزیه کلاستر بر اساس نشانگر RAPD ۵۹
۳-۲-۱-۳- نتایج حاصل از تجزیه به محورهای اصلی بر اساس نشانگر RAPD ۶۰

۳-۲-۲- نتایج حاصل از نشانگر ISSR ۶۲
۳-۲-۲-۱- بررسی ماتریس تشابه جاکارد و دایس بر اساس نشانگر ISSR ۶۳
۳-۲-۲-۲- نتایج حاصل از تجزیه کلاستر بر اساس نشانگر ISSR ۷۳
۳-۲-۲-۳- نتایج حاصل از تجزیه به محورهای اصلی بر اساس نشانگر ISSR ۷۴
۳-۲-۳- نتایج حاصل از ترکیب دو نشانگر RAPD و ISSR ۷۶
۳-۲-۳-۱- بررسی ماتریس تشابه جاکارد و دایس بر اساس ترکیب دو نشانگر RAPD و ISSR ۷۶
۳-۲-۳-۲- نتایج حاصل از تجزیه کلاستر بر اساس ترکیب دو نشانگر RAPD و ISSR ۸۲
۳-۲-۳-۳- نتایج حاصل از تجزیه به محورهای اصلی بر اساس ترکیب دو نشانگر RAPD و ISSR..... ۸۳
۳-۲-۴- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس دندروگرام ۸۵
۳-۳- آزمون منتل ۸۷
۳-۴- نتیجه گیری و پیشنهادات ۹۳
منابع مورد استفاده ۹۵

فهرست جداول و نمودارها

عنوان صفحه

جدول ۱-۱- مواد موجود در صد گرم دانه انار ۶
جدول ۲-۱- تعداد ژنوتیپ‌های انار جمع آوری شده به تفکیک مناطق مختلف ۲۷
جدول ۲-۲- فهرست صفات مورفولوژیک اندازه‌گیری شده در انار ۲۸
جدول ۲-۳- فهرست آغازگرهای RAPD مورد استفاده ۳۰
جدول ۲-۴- فهرست آغازگرهای ISSR مورد استفاده ۳۱
جدول ۲-۵- بافر استخراج روش ورابی و همکاران ۳۳
شکل۳-۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها بر اساس صفات مورفولوژیک مورد بررسی با استفاده از روش Ward ۴۳
جدول ۳-۱- نتایج حاصل از تجزیه تابع تشخیص به منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس صفات مورفولوژیک مورد بررسی ۴۴
شکل ۳-۲- نمودار پراکنش ژنوتیپ‌ها با استفاده از صفات مورفولوژیک بر اساس ماتریس واریانس کوواریانس ۴۵
شکل۳-۳- نمودار ۳ بعدی حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی با استفاده از صفات مورفولوژیک ۴۶
جدول ۳-۲- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس صفات مورد بررسی ۴۶
جدول ۳-۳- خصوصیات آغازگرهایRAPD که در بین ژنوتیپ های انار چند شکلی نشان دادند ۴۹
شکل ۳-۴- الگوی باندی نشانگر RAPD در ۴۴ نمونه انار مربوط به آغازگر OPC07 ..... ۵۱
شکل ۳-۵- الگوی باندی نشانگر RAPD در ۴۴ نمونه انار مربوط به آغازگر A7 ..... ۵۲
شکل ۳-۶- الگوی باندی نشانگر RAPD در ۴۴ نمونه انار مربوط به آغازگر C16 ..... ۵۳
جدول ۳-۴- ماتریس ضرایب تشابه جاکارد بر اساس نشانگر RAPD ۵۵
جدول ۳-۵- ماتریس ضرایب تشابه دایس بر اساس نشانگر RAPD ۵۷
شکل ۳-۷- دندروگرام حاصل از نشانگر RAPD بر اساس ضریب تشابه جاکارد ۶۰
شکل ۳-۸- نمودار پراکنش ژنوتیپ‌ها بر اساس نشانگر RAPD ۶۱
شکل۳-۹- نمودار ۳ بعدی حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی بر اساس نشانگر RAPD ۶۱
جدول ۳-۶- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس نشانگر RAPD ۶۲
جدول ۳-۷- خصوصیات آغازگرهای ISSR که در بین ژنوتیپ های انار چند شکلی نشان دادند ۶۵
شکل ۳-۱۰- الگوی باندی نشانگر ISSR در ۴۴ نمونه انار مربوط به آغازگر UBC807 ..... ۶۷
شکل ۳-۱۱- الگوی باندی نشانگر ISSR در ۴۴ نمونه انار مربوط به آغازگر UBC880 ..... ۶۸
جدول ۳-۸- ماتریس ضرایب تشابه جاکارد بر اساس نشانگر ISSR ۶۹
جدول ۳-۹- ماتریس ضرایب تشابه دایس بر اساس نشانگر ISSR ۷۱
شکل ۳-۱۲- دندروگرام حاصل از نشانگر ISSR بر اساس ضریب تشابه جاکارد ۷۴
شکل ۳-۱۳- نمودار پراکنش ژنوتیپ‌ها بر اساس نشانگر ISSR ۷۵
شکل۳-۱۴- نمودار ۳ بعدی حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی بر اساس نشانگر ISSR ۷۵

جدول ۳-۱۰- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس نشانگر ISSR ۷۶
جدول ۳-۱۱- ماتریس ضرایب تشابه جاکارد بر اساس ترکیب نشانگرهای RAPD و ISSR ۷۸
جدول ۳-۱۲- ماتریس ضرایب تشابه دایس بر اساس ترکیب نشانگرهای RAPD و ISSR ۸۰
شکل ۳-۱۵- دندروگرام حاصل از ترکیب دو نشانگر RAPD و ISSR بر اساس ضریب تشابه جاکارد ۸۳
شکل ۳-۱۶- نمودار پراکنش ژنوتیپ‌ها بر اساس ترکیب دو نشانگر RAPD و ISSR ۸۴
شکل۳-۱۷- نمودار سه بعدی حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی بر اساس ترکیب دو نشانگر RAPD و ISSR ۸۴
جدول ۳-۱۳- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس ترکیب دو نشانگر RAPD و ISSR ۸۵
جدول ۳-۱۴- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس دندروگرام برای ۴۴ ژنوتیپ انار بر اساس نشانگر RAPD..... ۸۶
جدول ۳-۱۵- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس دندروگرام برای ۴۴ ژنوتیپ انار بر اساس نشانگر ISSR..... ۸۶
جدول ۳-۱۶- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس دندروگرام برای ۴۴ ژنوتیپ انار بر اساس ترکیب نشانگرهای RAPD و ISSR ۸۶
شکل ۳-۱۸- نمایش همبستگی ماتریس‌های ضریب تشابه جاکارد نشانگرهای RAPD و ISSR ۸۸
شکل۳-۱۹- هیستوگرام آزمون منتل نشانگرهای RAPD و ISSR ۸۸
شکل ۳-۲۰- نمایش همبستگی ماتریس‌های ضریب تشابه نشانگر RAPD و داده‌های مورفولوژیک..... ۹۰
شکل۳-۲۱- هیستوگرام آزمون منتل نشانگر RAPD و داده‌های مورفولوژیک ۹۰
شکل ۳-۲۲- نمایش همبستگی ماتریس‌های ضریب تشابه نشانگر ISSR و داده‌های مورفولوژیک ۹۲
شکل۳-۲۳- هیستوگرام آزمون منتل نشانگر ISSR و داده‌های مورفولوژیک ۹۲

فصل اول

مقدمه و بررسی منابع

۱- مقدمه

به مجموعه ژن‌های موجود در یک جمعیت، ذخیره ژنتیکی آن گویند. تنوع ژنتیکی نشان دهنده تنوع موجود در این مجموعه می‌باشد. یکی از مهمترین و اولین اقداماتی که در جهت بررسی و نگهداری ذخایر ژنتیکی انجام می‌شود، بررسی تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف گیاهی است. علم و هنر اصلاح نباتات برپایه‌ی دو اصل تنوع و انتخاب استوار است. آگاهی اصلاحگر از تنوع موجود جهت افزایش آن یا انجام انتخاب مؤثر امری ضروری است. بررسی تنوع ژنتیکی موجب آگاهی اصلاحگر از محتوای ذخایر و وضعیت آنها از جهت رو به زوال بودن یا نبودن می‌شود. این بررسی‌ها در مورد گیاهان بومی کشور و گیاهانی که ارزش اقتصادی و صادراتی دارند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۲۲).

گام اول برای تعیین وضعیت ذخایر ژنتیکی و تشخیص شرایط گیاهان مبنی بر رو به انقراض بودن یا نبودن آنها، بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان در نواحی مختلف می‌باشد. همچنین یکی از اساسی ترین اصول اصلاح نباتات، آگاهی از تنوع موجود و روابط خویشاوندی است. در آغاز یک برنامه اصلاحی آگاهی از روابط فیلوژنی مکمل اطلاعات فنوتیپی در پیشبرد اصلاح جمعیت هاست و به انتخاب موثر والدین کمک می کند. بنابراین شناسایی سریع و قابل اطمینان ژنوتیپ‌ها برای انجام برنامه‌های اصلاحی ضروری است (۴۱).

ارقام بومی گیاهان مختلف و خویشاوندان وحشی آنها حاوی ژن‌های بسیار مهم مانند انواع مقاومت به تنش‌های خشکی، شوری، سرما، گرما و آفات و بیماری‌های مهم می‌باشند که معمولا به عنوان مخازن ژنی ارزنده مورد استفاده بهنژادگران قرار می‌گیرند (۴۱).

پیشرفت های اخیر در ژنتیک سلولی و مولکولی راه را برای فعالیت های بهنژادی هموارتر کرده است. از جمله این پیشرفت‌ها می‌توان به ساخت انواع نشانگرهای مولکولی اشاره کرد. یکی از مهمترین کاربرد نشانگرها ارزیابی محتوای ذخایر توارثی می‌باشد (۴۱).

با توجه به تنوع شرایط اقلیمی در ایران و وجود چهار فصل متمایز در نقاط مختلف کشور، گیاهان تنوع قابل توجهی پیدا کرده‌اند. این تنوع، ایران را به سرزمینی منحصر به فرد از نظر ذخایر ژنتیکی تبدیل کرده است.

بنابراین باید به سرعت در جهت حفظ ذخایر ژرم پلاسمی کشور و جلوگیری از تخریب و غارت آنها گام برداشت (۲۲).

یکی از مهمترین درختان میوه ای که از دیرباز در ایران کشت و کار می‌شده و اهمیت اقتصادی بالایی دارد، انار[1] می‌باشد. انار در مناطق مختلفی از ایران پراکنده است، اما به طور عمده در مناطق کویری از جمله استان‌های یزد، مرکزی، سیستان و بلوچستان، خراسان جنوبی و در منطقه غرب در استان کرمانشاه مورد کشت و کار قرار می‌گیرد. با توجه به جمع آوری بیش از ۷۶۰ ژنوتیپ انار از استان‌های مختلف کشور، ایران مرکز تنوع انار و به احتمال زیاد مرکز پیدایش آن نیز می‌باشد (۷۰). استان کرمانشاه حاوی ذخایر ژنتیکی ارزشمندی از گیاه انار است که بررسی تنوع این مجموعه از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد.

یکی از روش‌های بررسی تنوع ژنتیکی استفاده از خصوصیات ظاهری و مورفولوژیکی گیاه می‌باشد، اما مهمترین و بهترین ابزار بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین روابط خویشاوندی و فیلوژنی استفاده از نشانگرهای DNA می‌باشد. تفاوت بین توالی بازها در DNA موجودات که از والدین به نتاج منتقل می‌شود، می‌تواند به عنوان نشانگر ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد (۴۱). یکی از پرکاربردترین نشانگرهای DNA ، نشانگر RAPD[2] می‌باشد که برای تجزیه ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها به‌ویژه جمعیت‌هایی که مطالعات زیادی بر روی آنها انجام نگرفته، بکار می‌رود. این نشانگر توارث غالب - مغلوبی دارد و با استفاده از آغازگرهای اختیاری به دست می‌آید. این نشانگر دارای کاربرد بسیار گسترده ای در زیست شناسی مولکولی گیاهی می‌باشد. یکی دیگر از نشانگرهای DNA ، نشانگر ISSR[3] است که با استفاده از آغازگرهای نیمه اختیاری شامل واحدهای تکراری از توالی بازهای DNA می‌باشند، به دست می‌آید. توارث این نشانگر به صورت غالب - مغلوبی است و در مطالعات تاکسونومیکی و فیلوژنتیکی کاربرد وسیعی دارد (۴۱).

لذا به دلیل اهمیت تنوع ژنتیکی گیاهان به ویژه گیاهان بومی مناطق مختلف وکارایی بالای نشانگرهای مولکولی و مورفولوژیکی در این بررسی‌ها و همچنین عدم انجام چنین مطالعاتی در مورد انارهای غرب کشور، تحقیق حاضر به منظور مقایسه نمونه‌های انار در غرب کشور و بررسی روابط ژنتیکی آنها با استفاده از نشانگرهای DNA شامل RAPD و ISSR و همچنین ۴۸ صفت مورفولوژیک انجام شد.

1- *Punica granatum* L.

2- Random Amplified Polymorphic DNA

3- Inter Simple Sequence Repeats

۱-۱- پیدایش و تاریخچه انار

انار بومی ایران و رشته کوه‌های هیمالیا در شمال هندوستان است که از دوران باستان در نواحی مدیترانه‌ای آسیا، آفریقا و اروپا کشت می شده است. این گیاه با شرایط اقلیمی معتدل تا نیمه گرمسیری و بویژه نواحی با زمستان خنک و تابستان‌های گرم سازگاری یافته است. البته واریته های مختلفی از آن با شرایط مناطق سرد نیز سازگار شده‌اند (۶۰).

هومر شاعر یونانی در قرن هفتم قبل از میلاد در کتاب معروف خود ادیسه از درخت انار نام برده است (۵). توصیه حضرت محمد(ص) و تاکید بر مصرف آن در انجیل و همچنین ذکر انارستان های حضرت سلیمان(ع) در روایات، بیانگر قدمت کشت و کار این محصول در منطقه خاور میانه می‌باشد (۴). لغت انار در زبان انگلیسی[1] از کلمه ای یونانی مشتق شده و به معنی سیب با هسته زیاد می‌باشد (۶۰).

منشاء انار عمدتا ایران ذکر شده و از دوران باستان در مناطق وسیعی از ایران کشت و کار می شده است. در نواحی غربی مانند کردستان تا نواحی بلوچستان و امتداد آن تا افغانستان به صورت وحشی وجود داشته و بعدا به نواحی دیگر انتقال یافته است. امروزه پراکندگی آن در منطقه مدیترانه و نواحی مختلف اروپا، شمال آفریقا و بسیاری از مناطق دیگر یافت می‌شود (۱۳، ۶۷ و ۷۲).

۱-۲-گیاهشناسی انار

انار از سلسله گیاهان، دسته گیاهان گلدار، رده دو لپه ای ها، زیر رده رزیده[2] ، راسته میرتالس[3] و کوچکترین خانواده گیاهی یعنی پونیکاسه[4] است. این خانواده دارای یک جنس پونیکا[5] و دو گونه خوراکی[6] و غیر خوراکی[7] می‌باشد. گونه اول بومی ایران و نواحی مدیترانه است و شامل انارهای خوراکی می‌باشد اما گونه دیگر بومی هندوستان بوده و میوه آن خوراکی نیست (۱۳ و ۵۵).

1- Pomegranate
2- Rosidae
3- Myrtales.
4- Punicaceae
5- Punica
6- *P.granatum* L.
7- *P.protopunica*

انار درختچه‌ای است خزان دار که البته در نواحی گرم و مرطوب با زمستان‌های معتدل همیشه سبز است. ارتفاع متوسط درخت ۲ تا ۶ متر می‌باشد. لازمه میوه‌دهی در انار تابستان‌های گرم و پاییز طولانی و خشک است (۴).

انار گیاهی یکپایه است و گرده‌ها به راحتی مادگی خود را بارور می‌کنند. البته گرده افشانی بین گل‌ها توسط باد و حشرات نیز میسر است. گل‌ها پس از ۳ یا ۴ سالگی درختچه روی سیخک‌ها ظاهر می‌شوند. گل‌ها دارای دمگل کوتاه به رنگ سرخ، زرد و یا سفید با پهنای ۲ سانتی‌متر می‌باشند (۵۵). میوه انار سته، دارای پوست چرمی و تقریبا کروی شکل می‌باشد. برگ‌های آن ساده، کامل و بدون استیپول است. طرز قرار گرفتن برگ‌ها بر روی شاخه متفاوت بوده و به سه فرم متقابل، منفرد و فراهم مشاهده می‌شوند (۵۵ و ۶۰). ساقه انار ناهموار با چوب محکم و پوشیده از پوستی به رنگ مایل به سبز است. شاخه‌های متعدد آن، شکل نامنظم و رنگ قرمز مخصوصی دارند و غالبا در انتها به نوک تیز خار مانندی ختم می‌شوند (۱۳).

۱-۳- ژنتیک انار

تعداد کروموزوم‌های انار ۱۶= ۲x =۲n می‌باشد. گل‌های انار دو جنسی بوده و دو نوع هستند: گل‌های ثمری که بزرگترند و به میوه تبدیل می‌شوند، گل‌های علفی که کوچکترند و ریزش می‌کنند. انار هم به صورت خودگشنی (۴۵٪) و هم دگرگشنی (۵۵٪) توسط حشرات تولید مثل می‌کند. البته به دلیل تکثیر انار به طریق غیر جنسی (قلمه) مسئله‌ی خودگشنی و دگر گشنی چندان مورد توجه نبوده است (۶۰).

۱-٤- اکولوژی انار

شاخه‌های انار می‌تواند سرمای حدود ۱۲- درجه سانتی‌گراد را تحمل کند. نیاز سرمایی انار بسیار کم است و با ۲۰۰ تا ۴۰۰ ساعت دمای زیر ۷ درجه سانتی‌گراد برآورده می‌شود. این گیاه برای رسیدن کامل میوه نیاز به تابستان‌های بسیار گرم دارد. ریشه‌های انار تا عمق ۱/۵ متری زمین نفوذ کرده و نیاز به خاکی با زهکشی مناسب و بافت متوسط رسی دارد. انار به کم آبی مقاوم است و از این رو می توان آن را به صورت دیم نیز کشت و کار کرد، البته آبیاری مرتب در بالا بردن میزان و کیفیت محصول نقش عمده ای دارد (۹).

۱-۵- ترکیبات شیمیایی انار

قسمت‌های مختلف درخت انار، مخصوصا پوست ریشه و ساقه دارای مقداری در حدود ۲۰ درصد تانن اسید پیونیکوتانیک[1] می‌باشد. همچنین پوست درخت انار حاوی آلکالوئیدی به نام پلتیرین[2] است (۴ و ۱۳).

جدول ۱-۱- مواد موجود در صد گرم دانه انار(۱۲).

ماده	مقدار در صد گرم دانه
انرژی	۳۸ کالری
آب	۸۲ گرم
پروتئین	۴ گرم
چربی	۳ گرم
مواد نشاسته‌ای	۱۰ گرم
کلسیم	۴ میلی گرم
سدیم	۳ میلی گرم
پتاسیم	۲۶۰ میلی گرم
آهن	۵ میلی گرم
ویتامین B۱	۲ میلی گرم
ویتامین B۲	۳ میلی گرم
ویتامین B۳	۲ میلی گرم
ویتامین C	۴ میلی گرم

۱-٦- خواص دارویی انار

در طب سنتی از گل، برگ و پوست شاخه، ریشه و میوه جهت بهره‌مندی از اثرات دارویی انار استفاده می‌شود (۳).

انار میوه‌ای است سرشار از ویتامین و به علت داشتن آهن و سایر عناصر دیگر دیرهضم می‌باشد. خوردن

1- Punicotanice acid
2- Pelletierin